DOI: 10.22122/jims.v36i476.9995 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان سال سی و ششم/شماره‌ی ۴۶۷/هفته‌ی چهارم خرداد ۱۳۹۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۲/۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۲/۲۱ تاریخ چاپ: ۱۳۹۷/۳/۲۲

شناسایی الگوهای جهش ژنی حاصل از مقاومت به موپیروسین در ظهور سویه‌های بالینی استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین با استفاده از روش ذوب با کیفیت بالا

حامد طهماسبی[۱]، ساناز ده‌باشی[۲]، محمدرضا عربستانی[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر بر پروتئین‌سازی مانند موپیروسین، ممکن است در دراز مدت سبب جهش‌های ژنی در استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (Methicillin-resistant Staphylococcus aureus یا MRSA) شود. استفاده از روش‌های دارای حساسیت بالا، نقش مهمی در شناسایی این باکتری‌ها دارد. هدف از انجام مطالعه‌ی حاضر، شناسایی جهش‌های ژنی با استفاده از روش آنالیز منحنی دمای ذوب DNA با کیفیت بالا (High-resolution melting یا HRM) بود.

روش‌ها: مقاومت به موپیروسین با روش میکرودایلوشن مطابق با دستورالعمل Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) و تکثیر ژن mupA در ایزوله‌های بالینی MRSA با روش Polymerase chain reaction (PCR) مشخص گردید. سپس تجزیه و تحلیل با استفاده از نرم‌افزارهای StepOne و HRM انجام شد. نتایج تعیین توالی به عنوان روش استاندارد مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها: از ۱۶۲ ایزوله‌ی استافیلوکوک اورئوس، ۸۳ ایزوله (۵۱/۳۲ درصد) به متی‌سیلین مقاومت داشتند که از این میان، ۴۷ ایزوله (۵۲/۸۰ درصد) مقاومت حد بالا را نشان دادند. همه‌ی ایزوله‌های دارای مقاومت فنوتیپی نسبت به موپیروسین، حامل ژن mupA بودند. بیشترین و کمترین فراوانی به ترتیب در سویه‌های مقاوم به پنی‌سیلین (۷۹/۶۲ درصد) و سفتازیدیم (۶/۱۷ درصد) مشاهده شد. بیشترین ایزوله‌های استافیلوکوک اورئوس دارای مقاومت به موپیروسین از نمونه‌های زخم به دست آمد. در این بین، ایزوله‌های گرفته شده از زخم و خون دارای بیشترین جهش در باز A و G بودند. ارتباط معنی‌داری بین نوع نمونه‌ی بالینی و میزان جهش، مقاومت به موپیروسین و متی‌سیلین وجود داشت ($P < ۰/۰۵۰$).

نتیجه‌گیری: جهش‌های ژنی حاصل از آنتی‌بیوتیک موپیروسین، سبب مقاومت چندداروی و مقاومت به متی‌سیلین در استافیلوکوک اورئوس می‌شود.

واژگان کلیدی: موپیروسین، استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین، جهش ژنی، روش ذوب DNA

ارجاع: طهماسبی حامد، ده‌باشی ساناز، عربستانی محمدرضا. **شناسایی الگوهای جهش ژنی حاصل از مقاومت به موپیروسین در ظهور سویه‌های بالینی استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین با استفاده از روش ذوب با کیفیت بالا.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۷؛ ۳۶ (۴۷۶): ۴۱۰-۴۰۳

مقدمه

عفونت‌های بیمارستانی هم‌زمان با گسترش بیمارستان‌ها، همواره یکی از مشکلات عمده‌ی بهداشتی و درمانی بوده است و با افزایش طول مدت بستری شدن در بیمارستان، موجب افزایش ابتلا و مرگ و میر می‌شود و در نتیجه، هزینه‌های بیمارستانی را به شدت افزایش می‌دهد (۱). استافیلوکوک اورئوس، از جمله مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده‌ی عفونت‌های بیمارستانی و اکتسابی از جامعه می‌باشد و به دلیل قدرت بیماری‌زایی بالقوه و مقاومت روزافزون در برابر عوامل ضد باکتریایی، به یکی از مشکلات بهداشتی مهم در جهان تبدیل شده است (۲).

در بسیاری از موارد از آنتی‌بیوتیک موپیروسین جهت درمان سویه‌های استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (Methicillin-resistant Staphylococcus aureus یا MRSA) که توسط قطعه‌ی ژنی کروموزومی به نام mecA و بر روی کاست Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) قرار گرفته است، استفاده می‌شود (۴-۳). آنتی‌بیوتیک موپیروسین از نظر ساختاری شباهت زیادی به اسیدآمینه‌ی ایزولوسین دارد و در صورت استفاده، سبب فعال شدن این اسیدآمینه توسط ایزولوسیل tRNA- سنتتاز می‌شود و در نهایت، مانع از پروتئین‌سازی باکتری

۱- گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران

۲- گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

۳- دانشیار، مرکز تحقیقات بروسلوز و گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: محمدرضا عربستانی

Email: mohammad.arabestani@gmail.com

می‌گردد (۵). مقاومت به موپیروسین از لحاظ فنوتیپی به سه گروه تقسیم می‌شود که شامل مقاومت سطح پایین با حداقل غلظت مهاری ۸ تا ۲۵۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر، مقاومت سطح بالا با حداقل غلظت مهاری ۵۱۲ و یا بیشتر از آن و مقاومت سطح بسیار بالا با حداقل غلظت مهاری ۱۰۲۴ و یا بیشتر است که در آزمایش‌ها به چشم می‌خورد (۶). مقاومت‌های وابسته به موپیروسین در بیشتر مواقع توسط ژن mupA ایجاد می‌گردد. این ژن پلاسمیدی می‌تواند جهش‌های ژنی مختلفی را در سویه‌های MRSA ایجاد نماید و در بین سویه‌های حساس گردش کند و حساسیت به موپیروسین را کاهش دهد (۸-۷).

با توجه به نقش اصلی پلاسمید در بروز مقاومت به موپیروسین و ارتباط وجود ژن mupA با مقاومت به متی‌سیلین در سویه‌های استافیلوکوک اورئوس، شناسایی مقاومت به موپیروسین می‌تواند نقش مؤثری در مسیر درمان عفونت‌های استافیلوکوکی داشته باشد (۱۰-۹). در مطالعاتی که در انگلستان (۱۱)، ایرلند (۵) و یونان (۷) صورت گرفته است، مشخص گردید که ارتباط معنی‌داری بین مقاومت به موپیروسین و مقاومت به متی‌سیلین در سویه‌های بالینی استافیلوکوک اورئوس وجود دارد. همچنین، یکی از عوامل خطرساز در MRSA، مقاومت به موپیروسین مطرح شده است که می‌تواند زمینه‌ی مقاومت به چند آنتی‌بیوتیک را فراهم نماید (۵).

آنالیز دمای ذوب حاصل از DNA با کیفیت بالا (High-resolution melting یا HRM) برای اولین بار در سال ۲۰۰۳ معرفی شد. این روش تلفیقی از روش‌های تشخیصی دقیق مانند آنالیز دمای ذوب DNA (Melting curve analysis یا MCA) و آزمون Real-time polymerase chain reaction (Real time-PCR) می‌باشد. HRM نمونه‌های اسید نوکلئیک را بر اساس توالی، طول و حجم GC متمایز می‌سازد (۱۲). اساس کار این تکنیک بر پایه‌ی استفاده از الگو و رفتار ذوب رشته‌های DNA در یک دمای مشخص که وابستگی زیادی به پرایمر مورد استفاده دارد، استوار است (۱۳). به عنوان نمونه، اگر تغییر A < C در یک توالی در نظر گرفته شود، در حالت کلی ژنوتیپ‌هایی موجود به صورت A/C، A/A و C/C خواهد بود. الگوی منحنی برای حالت های A/A و C/C یکسان است و شکل C/C یک درجه بالاتر خواهد بود (۱۴).

هدف از انجام مطالعه‌ی حاضر، شناسایی و نقش جهش‌های ژنی حاصل از مقاومت به موپیروسین در ظهور سویه‌های MRSA بود که در خلال آن با بررسی پروفایل مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌توان به یک الگوی مناسب از وجود این جهش‌ها و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نیز دست یافت.

روش‌ها

طراحی مطالعه و جمع‌آوری ایزوله‌های بالینی: در یک دوره‌ی ۱۳ ماهه و طی بازه‌ی زمانی دی سال ۱۳۹۵ تا اسفند سال ۱۳۹۶، ایزوله‌های بالینی با رعایت اصول نمونه‌گیری از بیمارستان‌های مختلف (وابسته به دانشگاه علوم پزشکی همدان) و در نظر گرفتن بیماران مشکوک به عفونت‌های بیمارستانی به عنوان معیار ورود و بیماران فاقد این علایم به عنوان معیار خروج، جمع‌آوری شد. در مطالعه‌ی تجربی حاضر، ۱۶۲ ایزوله‌ی بالینی استافیلوکوک اورئوس از نمونه‌های بالینی مختلف (خون، ادرار، زخم پوستی، کاتتر، آبسه و سواپ بینی) با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی مانند کاتالاز، کواگولاز، کشت بر روی مانیتول (Mannitol) و DNAas جداسازی گردید (۳).

تعیین فنوتیپی سویه‌های MRSA و موپیروسین: برای تعیین حداقل غلظت مهاری سویه‌های MRSA (شرکت Liofilchem، ایتالیا) از روش E-test و برای تعیین حداقل غلظت مهاری سویه‌های مقاوم به موپیروسین (شرکت Mast، انگلستان) از روش میکرودایلوشن بر اساس دستورالعمل Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) استفاده گردید (۱۵).

تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های استافیلوکوک اورئوس: الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی به پنی‌سیلین ۱۰ واحدی، سیپروفلوکساسین ۳۰ میکروگرمی، جنتامایسین ۳۰ میکروگرمی، اریترومایسین ۱۵ میکروگرمی، کلرامفنیکل ۱۰ میکروگرمی، سفتازیدیم ۳۰ میکروگرمی و تتراسایکلین ۳۰ میکروگرمی (شرکت Mast، انگلستان) به روش انتشار از دیسک (Kirby-Bauer) مطابق با دستورالعمل CLSI تنظیم گردید. در این آزمون از سویه‌ی استاندارد ATCC25923 برای کنترل کیفی دیسک استفاده شد (۱۵).

استخراج DNA ژنومی: استخراج DNA ژنومی استافیلوکوک اورئوس با استفاده از کیت استخراج DNA (شرکت سیناکلون، ایران) انجام شد.

طراحی پرایمر mupA و شناسایی سویه‌های مقاوم به موپیروسین در استافیلوکوک اورئوس: برای سویه‌ی استافیلوکوک اورئوس مقاوم به موپیروسین، ژن mupA به عنوان سایت هدف انتخاب شد. سپس با کمک گرفتن از نرم‌افزارهای Gene Runner نسخه‌ی ۶/۵ و AlleleID نسخه‌ی ۶، طراحی پرایمرها صورت گرفت. به منظور تعیین دمای ذوب DNA و اتصال پرایمرهای طراحی شده نیز از نرم‌افزار Oligo نسخه‌ی ۶ استفاده گردید. جهت انجام واکنش PCR برای هر رقت شامل ۱۲ میکرولیتر از مستر میکس (Master Mix) (شرکت Ampliqon، آلمان)، ۱ میکرولیتر از DNAهای رقیق شده و ۲ میکرولیتر از هر پرایمر به غلظت ۱۰ پیکومولار، توالی پرایمرها

شـــــــــــامل F: GCGACGGTTTAGTTAATGCA و R: TGAACAATACCAGTTCCTTCTGA بـــا دمـــای ذوب ۰/۵ ± ۸۱/۰ درجه‌ی سلسیوس و طول ۲۹۷ جفت باز در نظر گرفته شد. برای تکثیر ژن مورد نظر نیز از دستگاه ترموسایکلر (شرکت Eppendorf، آلمان) استفاده گردید.

انجام آزمون MCA: از محلول McFarland 0.5 که مقدار آن $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ واحد تشکیل دهنده‌ی کلونی باکتری بود، به عنوان استوک اولیه استفاده شد. سپس رقت‌های مورد استفاده به ترتیب به صورت $۱۰^{۷}$، $۱۰^{۶}$، $۱۰^{۵}$، $۱۰^{۴}$، $۱۰^{۳}$، $۱۰^{۲}$، $۱۰^{۱}$، $۱۰^{۰}$، $۱۰^{-۱}$، $۱۰^{-۲}$، $۱۰^{-۳}$ و $۱۰^{-۴}$ (با معیار واحد تشکیل دهنده‌ی کلونی برای تمامی رقت‌ها) تهیه گردید. این آزمون جهت ارزیابی اولیه‌ی پرایمر مورد استفاده از نظر حساسیت طراحی شد؛ به این صورت که برای ژن mupA دمای ۰/۵ ± ۸۲/۰ درجه‌ی سلسیوس به دست آمد (۱۶).

انجام آزمون HRM و تعیین جهش: در مطالعه‌ی حاضر از دستگاه Real-time PCR (شرکت ABI-StepOnePlus، آمریکا) استفاده شد. تمامی مراحل کار در سه تکرار صورت گرفت. تنظیمات در جدول ۱ ارایه شده است. به منظور تعیین دمای ذوب (Melting) و خوانش متوالی، Ramp دمایی ۰/۳ درجه‌ی سلسیوس لحاظ گردید. محلول نهایی به منظور انجام آزمون HRM در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۴ میکرولیتر مستر میکس HRM highRox (شرکت Solis BioDyne، استونی)، ۲ میکرولیتر از هر پرایمر (غلظت ۲۰ پیکومولار) و ۱ میکرولیتر DNA الگو بود. حجم باقی‌مانده با محلول Diethyl pyrocarbonate (DEPC) جبران شد. تمام مراحل با استفاده از نرم‌افزارهای StepOne نسخه‌ی ۲/۳ و HRM نسخه‌ی ۳/۰/۱ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

جدول ۱. شرایط واکنش Real-time polymerase chain reaction (Real time-PCR) جهت انجام آزمون High resolution melting (HRM)

مراحل	دما (درجه‌ی سانتی‌گراد)	زمان	تعداد سیکل
شوک حرارتی اولیه	۹۴	۱۵ دقیقه	۱
جدا شدن قطعات DNA	۹۴	۱۵ ثانیه	۴۰
جفت شدن پرایمرها	۵۹	۳۰ ثانیه	
طویل شدن پرایمرها	۷۲	۳۰ ثانیه	
ذوب قطعات DNA	۹۵-۶۰	۹۰ دقیقه	۱

تعیین توالی محصولات: توالی محصولات به دست آمده از تکثیر ژن mupA در سویه‌های MRSA و مقاومت چندگانه به منظور داشتن استاندارد طلایی جهت شناسایی جهش‌ها، تعیین گردید.

داده‌ها با استفاده از روش‌های آمار توصیفی (تعیین فراوانی، درصد و میانگین) و تحلیلی (آزمون‌های t و $\chi^{۲}$) در نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. همچنین، از نرم‌افزار Chromas نسخه‌ی ۵/۱ و BioEdit نسخه‌ی ۷/۰۱ جهت آنالیز نتایج حاصل از تعیین توالی پرایمرهای طراحی شده استفاده گردید.

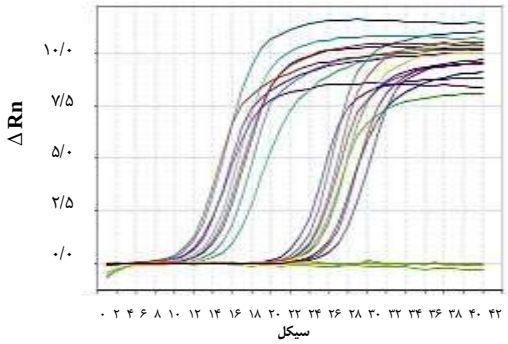
یافته‌ها

فراوانی استافیلوکوک اورئوس در نمونه‌های بالینی مختلف: از ۱۶۲ ایزوله‌ی بالینی استافیلوکوک اورئوس، ۸۳ ایزوله (۵۱/۲۳ درصد) دارای حداقل غلظت مهاری بیشتر از ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به آنتی‌بیوتیک سفوکسیتین و مقاوم به متی‌سیلین بود. از این میان، ۵۶ ایزوله (۴۷/۴۱ درصد) دارای حداقل غلظت مهاری بین ۴ تا ۲۵۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۵۴ ایزوله دارای حداقل غلظت مهاری بیشتر از ۵۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۴۷ ایزوله دارای حداقل غلظت مهاری بیشتر از ۱۰۲۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به آنتی‌بیوتیک موپیروسین بودند که به ترتیب مقاومت‌های حد پایین، حد بالا و حد بالاترین را از خود نشان دادند. از ۴۷ ایزوله‌ی MRSA و موپیروسین، ۹ ایزوله (۱۲/۱۶ درصد) از نمونه‌ی خون، ۱۱ ایزوله (۲۳/۴ درصد) از نمونه‌ی ادرار، ۱۷ ایزوله (۳۶/۱۷ درصد) از نمونه‌ی زخم، ۱ ایزوله (۲/۱۲ درصد) از نمونه‌ی کاتتر، ۷ ایزوله (۱۴/۸۹ درصد) از نمونه‌ی آبسه و ۲ ایزوله (۴/۲۵ درصد) نیز از نمونه‌ی سواپ بینی جدا شد.

الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فراوانی ژن mupA از مجموع ۱۶۲ ایزوله‌ی بالینی استافیلوکوک اورئوس، ۱۲۹ ایزوله (۷۹/۶۲ درصد) مقاوم به پنی‌سیلین، ۷۴ ایزوله (۴۵/۶۷ درصد) مقاوم به سیپروفلوکساسین، ۴۸ ایزوله (۲۹/۶۲ درصد) مقاوم به جنتامایسین، ۱۰۲ ایزوله (۶۲/۹۶ درصد) مقاوم به اریترومایسین، ۸۸ ایزوله (۵۴/۳۲ درصد) مقاوم به کلرامفنیکل، ۱۰ ایزوله (۶/۱۷ درصد) مقاوم به سفتازیدیم و ۵۹ ایزوله (۳۶/۴۱ درصد) مقاوم به تتراسایکلین بودند. از این میان، ۱۹ ایزوله (۱۱/۷۲ درصد) به متی‌سیلین، موپیروسین و سایر آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی مقاومت نشان دادند که به عنوان استافیلوکوک اورئوس مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک در نظر گرفته شدند. از ۵۶ ایزوله‌ی بالینی استافیلوکوک اورئوس دارای انواع مقاومت فنوتیپی با سطوح مختلف به موپیروسین، ۵۰ ایزوله (۸۹/۲۸ درصد) ژن mupA داشتند و ۶ ایزوله (۱۰/۷۱ درصد) فاقد ژن mupA بودند. از ۵۰ ایزوله‌ی دارای ژن mupA نیز ۴۷ ایزوله (۹۴ درصد) به متی‌سیلین و ۱۱ ایزوله (۲۲ درصد) به چند آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان دادند.

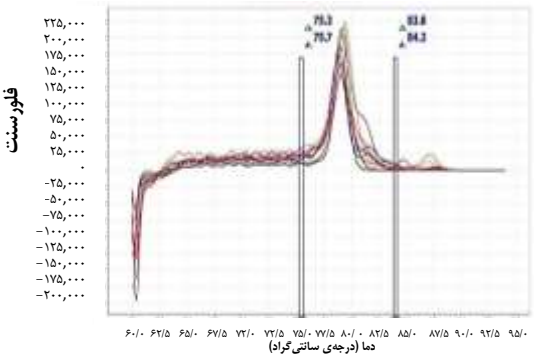
روش MCA: در ابتدا حضور ژن mupA با استفاده از تکنیک Real-time PCR بررسی گردید که در منحنی تکثیر، از CT ۱۰ به بعد

تکثیر ژن در تمام سویه‌ها مشاهده شد. همچنین، حساسیت و اختصاصیت پرایمرهای مورد استفاده برای mupA تا رقت 10^{-1} واحد تشکیل دهنده‌ی کلونی، قدرت شناسایی باکتری را داشت. همچنین، با در نظر گرفتن نزدیک‌ترین بازه‌ی دمایی به منظور تجزیه و تحلیل، دمای ذوب برای ژن mupA، ۰/۵ ± ۸۲/۰ درجه‌ی سلسیوس به دست آمد (شکل ۱).



شکل ۱. منحنی‌های تکثیر ژن mupA

روش HRM و جهش‌ها: ایزوله‌ی استافیلوکوک اورئوس دارای مقاومت چندگانه به همراه سویه‌ی استاندارد مورد بررسی قرار گرفت. با در نظر گرفتن بازه‌ی خطای دمایی ۰/۱ درجه‌ی سلسیوس، مشخص شد که ایزوله‌های مورد بررسی در غلظت استوک 0.5 McFarland، دارای جهش‌های مختلف در بازه‌های G، A و C بودند که این اختلاف بر اساس منحنی‌های ذوب DNA، منحنی مقادیر پیش‌ذوب و پس‌ذوب و منحنی اختلاف فلوروسنت مشاهده شد (شکل ۲).



شکل ۲. منحنی High resolution melting (HRM) حاصل از تکثیر ژن mupA عامل مقاومت به موپیروسین در ایزوله‌های استافیلوکوک اورئوس دارای مقاومت چندگانه

منحنی سیاه: ایزوله‌ی استاندارد استافیلوکوک اورئوس سویه‌ی ATCC25923

تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از تعیین توالی: ایزوله‌های استافیلوکوک اورئوس دارای مقاومت چندگانه نسبت به سویه‌ی استاندارد که فاقد هرگونه جهش در توالی ژنومی بود، جهش‌های متعددی را از خود نشان داد؛ بدین صورت که از ۱۱ ایزوله‌ی مورد بررسی، ۸ ایزوله دارای جهش‌های متعدد، ۲ ایزوله فاقد جهش و یک ایزوله دارای یک جهش بود. علاوه بر این، ارتباط معنی‌داری بین دو متغیر نوع نمونه‌ی بالینی و تغییر در اسیدآمینه وجود داشت؛ به طوری که با تغییر نوع ایزوله‌ی بالینی، میزان جهش و تغییرات اسیدآمینه‌ها بیشتر شد ($P < ۰/۰۵$) (جدول ۱).

جدول ۱. نتایج حاصل از جهش‌های مختلف در ایزوله‌های بالینی استافیلوکوک اورئوس

	MRSA		
ایزوله‌ی مورد بررسی	نوع نمونه‌ی بالینی	تغییر اسیدآمینه در ژن mupA	مقدار P
SA-۱۷۲	زخم	A→X A→G A→C	<۰/۰۵
SA-۱۷۳	زخم	A→T A→G A→C G→T C→A	<۰/۰۵
SA-۱۷۴	خون	A→T	<۰/۰۵
SA-۱۹	زخم	A→T A→X	<۰/۰۵
SA-۳۱	زخم	A→T A→X	<۰/۰۵
SA-۹	حذف	A→X	<۰/۰۵
SA-۱۵۱	ادرار	_	<۰/۰۵
SA-۹۴	زخم	A→X A→T	<۰/۰۵
SA-۵۱	زخم	G→X A→X	<۰/۰۵
SA-۸۱	زخم	A→T A→T	<۰/۰۵
SA-۱۸۱	خون	A→T G→C	<۰/۰۵

MRSA: Methicillin-resistant Staphylococcus aureus

بحث

در سال ۱۹۸۵ در انگلستان به واسطه‌ی باکتری سودوموناس فلورسانس، موپیروسین و یا سودومونیک اسید A تولید شد (۱۷). امروزه از این آنتی‌بیوتیک برای پیشگیری یا درمان عفونت‌های سطحی پوست همچون زرد زخم و عفونت زخم‌ها و سوختگی‌ها استفاده می‌گردد. بنابراین، مقاومت به این دارو در ایزوله‌های جدا شده از عفونت‌های پوستی و زخم بیشتر مشاهده می‌شود. نتایج مطالعه‌ی حاضر با توجه به میزان فراوانی ایزوله‌های بالینی و سویه‌های مورد بررسی، بیشترین موارد مقاومت به موپیرسوین را در باکتری‌های جدا شده از زخم گزارش نمود. اگرچه در عفونت‌های خون نیز سویه‌های حامل ژن mupA و مقاوم به موپیروسین مشاهده گردید.

وجود ارتباط معنی‌دار بین مقاومت به موپیروسین و متی‌سیلین در ایزوله‌های استافیلوکوک اورئوس در تحقیق حاضر بدین صورت بود که ایزوله‌های مقاوم به موپیروسین، همگی مقاوم به متی‌سیلین بودند. ایزوله‌های دارای مقاومت چندگانه به آنتی‌بیوتیک نیز همه مقاومت کامل به صورت سطح بالا نسبت به موپیروسین نشان دادند و مشخص گردید که افزایش مقاومت به موپیروسین با افزایش مقاومت به متی‌سیلین ارتباط مستقیمی دارد (۱۸). نتایج مطالعات مشابهی که در یونان (۷) و ایرلند (۵) صورت گرفت نیز نشان داد که یکی از عوامل خطر بروز مقاومت به متی‌سیلین، مقاومت به موپیروسین می‌باشد. شاید یکی از مهم‌ترین دلایلی که این آنتی‌بیوتیک می‌تواند سبب بروز مقاومت نسبت به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌های دیگر شود، وجود ژن mupA باشد که بر روی پلاسمید حمل می‌شود (۱۷). همچنین، استفاده‌های موضعی متعدد از این دارو می‌تواند یکی دیگر از دلایل این موضوع باشد؛ به طوری که فعالیت ضد میکروبی موپیروسین به واسطه‌ی شکسته شدن ترکیب دارو در بافت‌های بدن، به سرعت از بین می‌رود. بنابراین، از این دارو تنها به صورت پماد موضعی ۲ درصد استفاده می‌گردد (۱۹). در پژوهش حاضر نیز بیشترین ایزوله‌های دارای مقاومت چندگانه که دارای مقاومت به موپیروسین هم بودند، همه از زخم جدا شده بودند.

در تحقیقاتی که در کلمبیا (۲۰) و آمریکا (۲۱) انجام گرفت، نقش مهم و اساسی جهش‌های ژنی بر روی مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌های مختلف مطرح گردید و حضور و دخالت جهش‌های ژنتیکی به عنوان یکی از مهم‌ترین دلایل ظهور سویه‌های مقاوم به دارو بیان شد. در مطالعه‌ی حاضر، ایزوله‌های مقاوم به موپیروسین و حاصل از نمونه‌های زخم، بیشترین جهش‌های ژنی را داشتند که در همراهی با سایر عوامل مقاومتی مانند متی‌سیلین، زمینه‌ی ظهور سویه‌های دارای مقاومت چندگانه را نیز فراهم کرده بودند.

بررسی جهش‌های موجود در ژن mupA ایزوله‌های استافیلوکوک اورئوس با استفاده از روش HRM نشان داد که بیشترین جهش از نوع متیلاسیون و تبدیل باز آدنین به سایر بازها و حتی حذف بود. نتایج تحقیقات انجام شده در آمریکا نشان داد که شایع‌ترین جهش‌ها در بیشتر باکتری‌ها از نوع جهش‌های تبدیل بازهای C و G به سایر بازها می‌باشد (۲۱). در این راستا چنین می‌توان بیان کرد که وجود باز آدنین در زنجیره‌ی آغاز تکثیر یک ژن، نقشی کلیدی دارد؛ به طوری که توالی‌های مختلف بالادست و پایین‌دست ژنی، توالی‌های آغاز همانندسازی و حتی توالی‌هایی که منجر به قطع تکثیر می‌شوند، به نوعی از باز A تبعیت می‌کنند. مطالعه‌ای در لیتوانی به این نتیجه دست یافت که نوع ایزوله‌ی بالینی می‌تواند مقادیر جهش‌های ژنی را دستخوش تغییر کند (۲۲). اگرچه در پژوهش حاضر ارتباط معنی‌داری بین نوع ایزوله‌های بالینی و نوع جهش‌های ژنی مشاهده شد، اما این یافته در تحقیقات دیگر به روشنی مطرح نشده و این موضوع از دیدگاه علمی مورد بررسی قرار گرفته است. از این موضوع می‌توان به عنوان یکی از برتری‌های مطالعه‌ی حاضر نسبت به پژوهش‌های داخلی و خارجی نام برد که هم از دیدگاه آماری و هم از دیدگاه علمی- ژنتیکی مورد بررسی قرار گرفته است؛ چرا که از جمله دلایل علمی بروز جهش‌ها این است که وجود استافیلوکوک اورئوس در زخم، باکتری را در برابر عوامل محیطی مختلفی قرار می‌دهد که برای حفظ بقای خود تغییرات ساختاری گسترده‌ای را در ژنوم خودش ایجاد می‌کند. نتایج پژوهشی در آمریکا نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین مقاومت به موپیروسین و کلرهگزیدین در سویه‌های استافیلوکوک اورئوس جدا شده از زخم و بافت نرم با یکدیگر وجود دارد (۹). از این‌رو، متغیر بودن C + G در ایزوله‌های مختلف و تأثیر شرایط محیطی و غیر محیطی بر آن‌ها امر اجتناب ناپذیری است (۲۲، ۹).

حساسیت و دقت روش HRM در کنار طراحی اختصاصی ژن mupA جهت شناسایی سویه‌های مقاوم به موپیروسین، بیان کننده‌ی صحت و دقت این روش در شناسایی جهش‌های ژنی در MRSA است؛ به طوری که گاهی دقت این روش با روش‌های مبتنی بر پروب مقایسه می‌شود. همچنین، با قرار دادن نتایج حاصل از تعیین توالی در کنار نتایج روش HRM، منحنی‌های به دست آمده را می‌توان با دقت و اطمینان بیشتری مورد ارزیابی قرار داد. بدین صورت که تجزیه و تحلیل منحنی‌های مختلف HRM جهت شناسایی سویه‌های مختلف باکتریایی و تعیین توالی سویه‌ی استاندارد و سویه‌های مورد مطالعه و مقایسه‌ی آن‌ها، می‌تواند الگوی مناسبی را جهت شناسایی سویه‌های مقاوم و دارای مشابهت جهشی در تست‌های بعدی ایجاد کند. علاوه بر این، تفسیر نتایج به دست آمده از HRM می‌تواند دستخوش خطای انسانی و مراحل مختلف کار قرار گیرد (۲۳). با انجام تعیین توالی ایزوله‌های مورد بررسی، می‌توان در از بین این خطاها و دقت بیشتر در آنالیز منحنی‌های HRM قدم برداشت.

وجود عامل خطر مقاومت به موپیروسین در کنار فراهم کردن زمینه‌ی مقاومت به متی‌سیلین، می‌تواند شرایطی را ایجاد کند تا استافیلوکوک اورئوس دارای مقاومت چندگانه نیز شکل بگیرد. از این‌رو، دخالت متغیرهایی مانند نوع نمونه‌ی بالینی، نیاز به استفاده از روش‌های دقیق و سریع مانند HRM را در شناسایی چنین سویه‌هایی بیشتر می‌کند و با در دست داشتن الگوی ژنی عامل بیماری‌زای یک بیمار، دقت و اختصاصیت بیشتری را می‌توان در امر درمان دنبال کرد.

تشکر و قدردانی

مطالعه‌ی حاضر برگرفته از طرح تحقیقاتی با شماره‌ی ۹۶۰۹۲۸۶۰۸۱ و کد اخلاق IR.UMSHA.REC.1396.637، مصوب معاونت پژوهش و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی همدان می‌باشد. بدین وسیله نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از این معاونت ابراز می‌دارند.

References

1. Walter J, Noll I, Feig M, Weiss B, Claus H, Werner G, et al. Decline in the proportion of methicillin resistance among Staphylococcus aureus isolates from non-invasive samples and in outpatient settings, and changes in the co-resistance profiles: An analysis of data collected within the Antimicrobial Resistance Surveillance Network, Germany 2010 to 2015. BMC Infect Dis 2017; 17(1): 169.
2. Sweeney NL, Lipker L, Hanson AM, Bohl CJ, Engel KE, Kalous KS, et al. Docking into Mycobacterium tuberculosis thioredoxin reductase protein yields pyrazolone lead molecules for methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Antibiotics (Basel) 2017; 6(1).
3. Tahmasebi H, Zeyni B, Dehbashi S, Motamedi H, Vafaeefar M, Keramat F, et al. The study of blaZ and mecA gene expression in methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains and the relationship between the gene expression patterns. J Isfahan Med Sch 2017; 35(443): 1062-7. [In Persian].
4. Sussmuth RD, Mainz A. nonribosomal peptide synthesis-principles and prospects. Angew Chem Int Ed Engl 2017; 56(14): 3770-821.
5. Caffrey AR, Quilliam BJ, LaPlante KL. Risk factors associated with mupirocin resistance in meticillin-resistant Staphylococcus aureus. J Hosp Infect 2010; 76(3): 206-10.
6. Hesami S, Hosseini SD, Amouzandeh-Nobaveh A, Eskandari S, Ghaznavi-Rad E. Phenotypic and genotypic determination of mupirocin resistance among methicillin susceptibility and resistance in staphylococci isolated from nosocomial infections. J Mazandaran Univ Med Sci 2014; 23(1): 30-9. [In Persian].
7. Stefanaki C, Ieronymaki A, Matoula T, Caroni C, Polythodoraki E, Chryssou SE, et al. Six-year retrospective review of hospital data on antimicrobial resistance profile of Staphylococcus aureus isolated from skin infections from a single institution in GREECE. Antibiotics (Basel) 2017; 6(4).
8. International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): Guidelines for reporting novel SCCmec elements. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53(12): 4961-7.
9. Fritz SA, Hogan PG, Camins BC, Ainsworth AJ, Patrick C, Martin MS, et al. Mupirocin and chlorhexidine resistance in Staphylococcus aureus in patients with community-onset skin and soft tissue infections. Antimicrob Agents Chemother 2013; 57(1): 559-68.
10. Rajkumari N, Mathur P, Bhardwaj N, Gupta G, Dahiya R, Behera B, et al. Resistance pattern of mupirocin in methicillin-resistant Staphylococcus aureus in trauma patients and comparison between disc diffusion and E-test for better detection of resistance in low resource countries. J Lab Physicians 2014; 6(2): 91-5.
11. Krishnan PU, Miles K, Shetty N. Detection of methicillin and mupirocin resistance in Staphylococcus aureus isolates using conventional and molecular methods: A descriptive study from a burns unit with high prevalence of MRSA. J Clin Pathol 2002; 55(10): 745-8.
12. Hosseini SJ, Nazemi A, Hashemi M, Miri Nargesi M, Sharifi SA. Application of high resolution melting technique for detection of germ line single nucleotide polymorphisms in STK11 gene among patients with various gastrointestinal cancers. Med Sci J Islamic Azad Univ Tehran Med Branch 2012; 21(4): 233-7. [In Persian].
13. Haryono SJ, Datasena IGB, Hariadi A, Mulyarahardj R. High resolution melting (HRM) analysis for genetic changes in BRCA1/2 gene. Supplement J Med Sci 2016; 48(4): 26.
14. Chernukha IM, Minaev MY, Kurbakov KA, Bataeva DS. Detection and identification of S. carnosus in starter cultures using real time PCR and subsequent HRM analysis of amplification products. Procedia Food Science 2015; 5: 38-41.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI supplement M100. 27th ed. Wayne, PA: CLSI; 2017.
16. Arabestani MR, Tahmasebi H, Zeyni B. Diagnostic value of melting curve analysis based on multiplex-real time PCR in identification of enterococci species. J Mazandaran Univ Med Sci. 2017; 26(145): 234-47. [In Persian].
17. Driscoll DG, Young CL, Ochsner UA. Transient loss of high-level mupirocin resistance in Staphylococcus aureus due to MupA polymorphism. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51(6): 2247-8.
18. Simor AE, Stuart TL, Louie L, Watt C, Ofner-Agostini M, Gravel D, et al. Mupirocin-resistant, methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains in Canadian hospitals. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51(11): 3880-6.
19. Palepou MF, Johnson AP, Cookson BD, Beattie H, Charlett A, Woodford N. Evaluation of disc diffusion and Etest for determining the susceptibility of Staphylococcus aureus to mupirocin. J Antimicrob Chemother 1998; 42(5): 577-83.
20. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance. Microbiol Spectr 2016; 4(2).
21. Hershberg R, Petrov DA. Evidence that mutation is universally biased towards AT in bacteria. PLoS Genet 2010; 6(9): e1001115.

22. Bratchikov M, Mauricas M. Development of a multiple-run high-resolution melting assay for Salmonella spp. genotyping HRM application for Salmonella spp. subtyping. Diagn Microbiol Infect Dis 2011; 71(3): 192-200.

23. Carbonell P, Turpin MC, Torres-Moreno D, Molina-Martinez I, Garcia-Solano J, Perez-Guillermo M, et al. Comparison of allelic discrimination by dHPLC, HRM, and TaqMan in the detection of BRAF mutation V600E. J Mol Diagn 2011; 13(5): 467-73.

DOI: 10.22122/jims.v36i476.9995 Published by Vesnu Publications

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 36, No. 476, 4th Week, June 2018**

Received: 23.04.2018 Accepted: 11.05.2018 Published: 12.06.2018

Identification of Gene Mutation Patterns Obtained from Resistance to Mupirocin in Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Clinical Strains, Using High-Resolution Melting (HRM) Method

Hamed Tahmasbi[1], Sanaz Dehbashi[2], Mohammad Reza Arabestani[3]

Original Article

Abstract

Background: Effective antibiotics on the translation pathway, such as mupirocin, may cause gene mutations in methicillin-resistant Staphylococcus aureus in long-term. Using high-sensitivity methods plays an important role in identifying these bacteria. Our goal was to identify these mutations using high-resolution melting (HRM) curve of DNA analysis.

Methods: Resistance to mupirocin was identified using disc microdilution plate method in according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guideline. mupA gene amplification in the isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus was done using polymerase chain reaction (PCR). Then, analysis was performed using StepOne Software and HRM software. Sequencing was used as gold-standard method for confirming of the results.

Findings: Out of 162 Staphylococcus aureus isolates, 83 (51.32%) were methicillin resistant. Among methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates, 47 (52.80 %) showed high level resistance to mupirocin carrying mupA. The most and lowest resistance was observed for penicillin (79.62%) and ceftazidime (6.17%), respectively. Moreover, all of multi-drug resistant (MDR) isolates were mupirucin resistant, too. Among mupirocin-resistant Staphylococcus aureus, wound samples were the most prevalent. Besides, isolates obtained from wound and blood demonstrated the highest mutation in A and G bases. Meaningful association was observed between the type of clinical sample and mutation rate, and resistance to mupirocin and methicillin ($P < 0.05$).

Conclusion: Mupirocin-derived gene mutations provide multi-drug resistance in methicillin-resistant Staphylococcus aureus.

Keywords: Mupirocin, Methicillin resistance, Staphylococcus aureus, Mutation, DNA melting

Citation: Tahmasbi H, Dehbashi S, Arabestani MR. **Identification of Gene Mutation Patterns Obtained from Resistance to Mupirocin in Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Clinical Strains, Using High-Resolution Melting (HRM) Method.** J Isfahan Med Sch 2018; 36(476): 403-10.

1- Department of Microbiology, School of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran
2- Department of Microbiology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran
3- Associate Professor, Brucellosis Research Center AND Department of Microbiology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran
Corresponding Author: Mohammad Reza Arabestani, Email: mohammad.arabestani@gmail.com